

<p>95-070232/10 B04 D16 TOYJ 93.06.11 TOSOH CORP *JP 06345667-A 93.06.11 93JP-140586 (94.12.20) A61K 39/395 Osteoporosis treatment - comprises admin. of substance which inhibits GP.130 signal transmission C95-031369</p>	<p>B(4-G1, 14-N1) D(5-H1, 5-H8, 5-H9, 5-H11A, 5-H12)</p>
<p>Osteoporosis is treated by inhibiting gp 130 signal transmission. Also claimed is osteoporosis treating agent comprising substance which inhibits gp 130 signal transmission. Substance is the antibody against gp 130. Typical example of inhibitor is anti gp 130 antibody such as GPX 7, GPX 22 and GPZ 35. ADVANTAGE - Various roles of bioactive substance such as IL-6 which is transmitted through gp 130 can be clarified. In an example, simple cells were collected from human blood, and cultured in the alpha-medium contg. 10 % bovine serum. Thus obtd cells were cultured in methyl cellulose agar-agar in the presence of 100 pg/ml GM-CSF for 7 days. Then recombinant human IL-6, anti gp 130 monoclonal antibody GPX 7 and GPZ 35 were added, and cultured for 14 days. Colony number of the obtained osteoclast was measured by anti-vitro-nectine receptor alpha chain monoclonal antibody 23C6. Results showed that increased number of osteoclast due to IL-6 was inhibited by GPX7 and GPZ3 dose-</p>	<p>dependently, and 1 microgram/ml of GPX7 and GPZ35 decreased to the basic level, whereas 10-50 microgram/ml of GPX7 or GPZ35 was required to decrease antibody-producing activity and myeloma cell proliferation activity due to IL-6 to basic level. (5pp Dwg.No.0/0)</p>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-345667

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 12 月 20 日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	A B J N	9284-4C		
	A D T D	9284-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-140586

(22) 出願日 平成 5 年 (1993) 6 月 11 日

(71) 出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72) 発明者 久米川 正好

埼玉県川越市霞ヶ関東3-1-16

(72) 発明者 栗原 徳善

埼玉県坂戸市中富町55-1-406

(72) 発明者 保川 清

神奈川県相模原市相模大野7-37-17-401

(54) 【発明の名称】 骨粗鬆症治療方法及び治療薬

(57) 【要約】

【目的】 g p 1 3 0 のシグナル伝達作用を阻害することによる、骨粗鬆症治療方法及び g p 1 3 0 のシグナル伝達作用を阻害する物質を有効成分とする、骨粗鬆症治療薬の提供。

【構成】 g p 1 3 0 のシグナル伝達作用を阻害することによる、骨粗鬆症治療方法及び g p 1 3 0 のシグナル伝達作用を阻害する物質を有効成分とする、骨粗鬆症治療薬。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 gp130のシグナル伝達作用を阻害することによる、骨粗鬆症治療方法。

【請求項2】 gp130のシグナル伝達作用を阻害する物質を有効成分とする、骨粗鬆症治療薬。

【請求項3】 gp130のシグナル伝達作用を阻害する物質がgp130に対する抗体であることを特徴とする請求項2の骨粗鬆症治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は骨粗鬆症の治療方法及び骨粗鬆症の治療薬に関するものであり、詳しくは、ヒトインターロイキン-6（以下IL-6と略す）等の種々のサイトカイン類のシグナル伝達に関与する蛋白質であるgp130のシグナル伝達作用を阻害することによる方法及び該シグナル伝達作用を阻害する物質を有効成分とする治療薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】骨粗鬆症は、骨の量が減少することにより、骨折しやすくなる病気である。骨の代謝においては、骨吸収と呼ばれる骨が壊される過程と、骨形成と呼ばれる骨が作られる過程の間に一定のバランスが保たれているが、骨粗鬆症ではこのバランスがくずれ、骨吸収が異常に高まる結果生じるものである。

【0003】骨吸収を主に担う細胞は破骨細胞と呼ばれており、血液幹細胞由来の単球系の細胞であることが知られている。最近、ヒト血球を培養して破骨細胞を調製する方法（Kuriharaら、J. Immunol., 144, p4226, 1990年参照）、ウサギの骨から破骨細胞を調製する方法

（Tezukaら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 186, p911, 1992年参照）、更には破骨細胞の骨吸収活性を測定する方法（Takedaら、Bone and Mineral, 17, p347, 1993年参照）が報告され、破骨細胞の形成や骨吸収作用に対する種々の薬剤の直接的な効果が比較検討できるようになったgp130は、代表的な多機能性サイトカインであるIL-6のシグナル伝達に関与する、細胞膜上に存在する分子量13万の糖蛋白として発見され（Tagaら、Cell, 1989年参照）、その後、IL-6だけでなく、LIF（leukemia inhibitory factor、白血病阻害因子）、オンコスタチンM更にはCNTF（ciliary neurotrophic factor）のシグナル伝達にも関与することが報告されている（Tagaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 1992年参照）。

【0004】一方Kuriharaらは、IL-6存在下でヒト骨髓細胞を長期間培養すると破骨細胞様の多核細胞が形成されることを（Kuriharaら、J. Immunol., 144, p4226, 1990年参照）、Jilkaらは子宮を切除したマウスの血清中のIL-6の濃度上昇と破骨細胞数増加の相関性を報告した（Jilkaら、Science, 257, p88, 1992年参照）。IL-6が骨粗鬆症の発症に何らかの役割を果た

していることが示唆される。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述の報告はIL-6が骨粗鬆症の発症に何らかの役割を果たしていることを示唆するものの、具体的な骨粗鬆症の治療方法や治療薬については何等報告していない。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、IL-6の作用を阻害することで骨粗鬆症を治療し得るか否かについて鋭意研究を行った結果、IL-6のシグナル伝達に重要な役割を果たすgp130の該シグナル伝達作用を阻害することで骨粗鬆症を治療し得ることを見出し、本発明を完成した。即ち本発明は、gp130のシグナル伝達作用を阻害することによる、骨粗鬆症治療方法である。また本発明は、gp130のシグナル伝達作用を阻害する物質を有効成分とする、骨粗鬆症治療薬である。以下本発明を更に詳細に説明する。

【0007】1. gp130のシグナル伝達作用の阻害剤

本発明中のgp130とは、IL-6のシグナルを伝達する蛋白質として発見されたものであり、（1）IL-6とIL-6レセプターとの複合体と結合するが、IL-6の非存在下ではIL-6レセプターと結合せず、（2）SDS-ポリアクリルアミド電気泳動において130kDaの見かけ上の分子量を示す、糖蛋白である。gp130をコードする遺伝子はヒト及びマウスから単離され、その一次構造は決定されている（Hibiら、Cell, 63, p1149, 1990年参照、Saitoら、J. Immunol., 148, p4066, 1992年参照）。またgp130は細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域から構成され、IL-6だけでなく、LIF（leukemia inhibitory factor、白血病阻害因子）、オンコスタチンM、CNTF（ciliary neurotrophic factor）のシグナル伝達にも関与することが知られている（Tagaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 89, p10998, 1992年参照）。

【0008】本発明中のgp130のシグナル伝達作用というのは、細胞膜上のgp130が、IL-6、LIF、オンコスタチンM、CNTFの刺激にそれぞれ反応し、該細胞に何らかのシグナルを伝え、その結果として該細胞が増殖や分化をおこしたり、何らかの生理活性物質を放出したり、何らかのレセプター分子を細胞表面に発現したりすることを意味する。このようなシグナル伝達作用としては、例えばIL-6で抗原刺激を受けたB細胞を刺激したとき、B細胞膜上のgp130が細胞内にシグナルを伝達し、その結果としてB細胞の抗体産生が増加することや、LIFで白血病細胞株M1を刺激したとき、M1細胞膜上のgp130がシグナルを細胞内に伝達し、その結果としてマクロファージに分化することや、IL-6で肝細胞を刺激したとき、肝細胞膜上のgp130が細胞内にシグナルを伝達し、その結果とし

て急性期タンパク質を発現すること等が挙げられる。

【0009】従って、本発明中のgp130のシグナル伝達作用阻害剤は、上述のgp130のシグナル伝達作用を阻害するもの全てを意味する。gp130はその細胞外領域でリガンド分子あるいはリガンド分子とレセプター分子の複合体を認識し、細胞内領域でシグナルを細胞内に伝達するから、該阻害剤は、細胞外領域の作用と細胞内領域の作用のどちらを阻害するものでも良い。

【0010】細胞外領域の作用を阻害するものとして、例えば抗gp130抗体を例示できる。また、IL-6とIL-6レセプターとの複合体がgp130と結合するという性質からは、IL-6とは結合できるが生じた複合体がgp130と結合できないような変異型IL-6レセプターも例示できる。中でも調製が容易で、かつgp130を特異的に認識し得る抗gp130抗体を阻害剤として使用することが好ましい。

【0011】より具体的に、gp130に対する抗体は、IL-6とIL-6レセプターとの複合体とgp130が結合するのを立体的に妨害し得る様なものであれば良いが、前記複合体とgp130が結合する部分と結合することが望ましい。阻害効果の程度については、一定量を添加あるいは投与したときに、より強い阻害効果を有する抗体、あるいは同程度の阻害効果を達成するために、より少量の添加あるいは投与で足りる抗体ほど、gp130のシグナル伝達作用に対する阻害効果の強い抗体であり好ましい。このような抗体として例えば、GPX7、GPX22又はGPZ35 (Tagaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 89, p10998, 1992年参照)等のモノクローナル抗体が特に好ましい。

【0012】以上の抗体を調製するために免疫原として用いるgp130は、細胞膜から精製した天然型gp130、培養上清、血清あるいは尿から精製した天然型gp130、更には遺伝子工学的に作製したgp130のどれでも良いが、遺伝子工学的手法によれば大量のgp130を調製することが可能である。gp130の調製法としては、1991年度日本免疫学会総会・学術集会記録21巻p108に斎藤らによる報告がある。なお、調製された抗gp130抗体は、本発明の治療方法又は治療薬として使用する前に、骨粗鬆症患者で見出だされるgp130を認識し得ることを確認すること良い。

【0013】本発明でgp130のシグナル伝達作用を阻害する物質として好ましく使用される抗体の中でも、特にgp130に対するモノクローナル抗体が良い。このようなモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、常法に従って調製することができる。例えば前記の

免疫原のいずれかによりマウス等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得、これを樹立されたミエローマ細胞と融合せしめ、次に目的とする反応性、すなわちIL-6作用を阻害する抗gp130抗体を産生しているクローンを選択する等である。IL-6作用の阻害の程度については、本発明で提供される抗gp130抗体等と比較すればよい。また、多数のクローンから目的とするクローンを得るため、まずgp130との結合性を確認し、一定数のクローンを選択してから、gp130のシグナル伝達作用に対する阻害効果を比較しても良い。このようにして調製されたハイブリドーマを培養すれば、培養上清からモノクローナル抗体を採取できる。あるいは前記ハイブリドーマを動物の腹くう内に接種し、腹水を得、これからモノクローナル抗体を単離することもできる。ハイブリドーマ細胞培養上清中の抗体または腹水中の抗体は、常法に従って、例えば硫酸アンモニウム塩析により濃縮することができ、さらにアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0014】本発明に従って骨粗鬆症を治療するには、前記したように、例えば抗gp130抗体等を患者に投与すれば良い。

【0015】

【実施例】以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0016】実施例1. 破骨細胞の形成に対する抗gp130モノクローナル抗体の効果

Kuriharaら (J. Immunol., 144 巻、p4226、1990年) に示された方法によりヒト血液から破骨細胞を形成させ、それに対する抗gp130抗体の阻害効果を調べた。

【0017】ヒト血液から、フィコールを用いる通常の方法で単核細胞を集め、 α -MEM培地、10%牛血清中で培養した。まず、培養容器に付着する細胞を除き、抗CD34抗体を培養容器に付着させ、培養容器に付着する細胞を集めた。このようにして得た細胞をメチルセルローズ寒天中で、100 pg/ml のGM-CSF存在下で7日間培養した。次に、リコンビナントヒトIL-6を100 μ g/ml存在下で、抗gp130モノクローナル抗体GPX7、GPZ35をそれぞれ添加し、14日間培養した。生じた破骨細胞のコロニー数は抗ビトロネクチンレセプター α 鎖モノクローナル抗体23C6を用いて測定した。結果を表1に示す

【0018】

【表1】

添加物		破骨細胞形成数 (%)
IL-6 (0 μ g/ml)		54 \pm 6
IL-6 (100 μ g/ml)		109 \pm 14 (100)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPX7 (10 ng/ml)	101 \pm 14 (92)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPX7 (100 ng/ml)	84 \pm 13 (77)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPX7 (1000 ng/ml)	58 \pm 9 (53)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPZ35 (10 ng/ml)	111 \pm 10 (102)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPZ35 (100 ng/ml)	86 \pm 8 (79)
IL-6 (100 μ g/ml)	GPZ35 (1000 ng/ml)	67 \pm 8 (61)

【0019】表1より明らかなように、IL-6による破骨細胞の形成数の増加は、GPX7、GPZ35により濃度依存的に阻害され、約1 μ g/mlの添加ではほぼ基底レベルにまで低下した。IL-6によるB細胞株への抗体産生誘導作用やミエロマ細胞増殖作用に対するGPX7、GPZ35の阻害効果(特願平4-134329)では、基底レベルにまで低下させるのに必要な抗体の添加量は10~50 μ g/mlである。従って、gp130のシグナル伝達作用の阻害による破骨細胞の形成阻害は顕著であることが示された。

【0020】実施例2. 破骨細胞の骨吸収作用形成に対する抗gp130モノクローナル抗体の効果
Tezukaら(Biochem. Biophys. Res. Commun. 186巻、p911、1992年)に示された方法により、ウサギから破骨細胞を調製した。生後10日目のウサギ(体重110 g)から長骨を取り出し、はさみで切り刻んだ後、3 mlの α -MEM培地、5%牛血清中に浸した。次に、20 mlの同培地中で、ボルテックスによる30秒間の緩やかに攪拌を2回

行った後、遠心して上清を集めた。こうして、約 2×10^7 個の骨細胞を得た。それを直径90 mmのデッシュで2日間培養し、破骨細胞を得た。

【0021】次に、Takedaら(Bone and Mineral, 17巻、p347、1993年)に示された方法により、象牙の切片上での破骨細胞の骨吸収作用における抗gp130抗体の阻害効果を調べた。6 \times 0.15 mmの象牙のスライスを一晚プレスした後、70%エタノール中で超音波処理を行った。次に、96穴ウエル中で、上述のウサギ由来破骨細胞と象牙を混合し、250 μ lの α -MEM培地、5%牛血清中で2日間培養した。次にモルモット由来抗ヒトgp130ポリクローナル抗体を種々の濃度に加え、2日間培養した。コントロールとしては 10^{-7} Mのカルシトニンを用いた。2日間の培養の後、生じたピット数を計測した。同様の操作を2度行った結果を(操作1及び操作2)を表2に示す。

【0022】

【表2】

操作1		
添加物		ピット数 (%)
なし		61 ± 2
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(3 ng/ml)	51 ± 10 (84)
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(9 ng/ml)	25 ± 7 (41)
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(27 ng/ml)	19 ± 2 (31)
カルシトニン	(10 ⁻⁷ M)	29 ± 6 (48)
操作2		
添加物		ピット数 (%)
なし		114 ± 14
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(3 ng/ml)	59 ± 9 (52)
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(9 ng/ml)	51 ± 1 (45)
抗 gp 130 ポリクローナル抗体	(27 ng/ml)	40 ± 8 (35)
カルシトニン	(10 ⁻⁷ M)	47 ± 23 (41)

【0023】表2より明らかなように、モルモット由来抗ヒト gp 130 ポリクローナル抗体は濃度依存的にピットの形成を阻害した。これはウサギ破骨細胞の細胞膜上の抗 gp 130 に、抗ヒト gp 130 抗体が結合し、その結果、ウサギ破骨細胞の骨吸収作用が阻害された結果である。コントロールのカルシトニンの効果と比較して、gp 130 のシグナル伝達作用の阻害による破骨細胞の骨吸収作用阻害効果は顕著であることが示された。

【0024】

【発明の効果】本発明の gp 130 のシグナル伝達作用を阻害することを特徴とする骨粗鬆症治療薬により、従来には存在しなかった新しいタイプの骨粗鬆症治療薬の開発が可能になる。また抗 gp 130 抗体を用いた基礎研究により、gp 130 を介してシグナルが伝達される IL-6 等の生理活性物質の骨粗鬆症での種々の役割を同定することが可能となり、このことは、骨粗鬆症の研究、さらにはそれらの成果に基づく新しい治療薬診断薬等の開発等に大きな意義を有するものである。